

· 基础研究 ·

清肠化湿方对溃疡性结肠炎湿热证小鼠 NLRP6 蛋白及相关炎症因子表达的影响

傅书山¹ 朱磊² 王琼³ 沈洪²

摘要 目的 探讨清肠化湿方对溃疡性结肠炎(UC)湿热证小鼠 NLRP6 蛋白及相关炎症因子和紧密连接蛋白 Claudin-2、Claudin-5 的影响。方法 60 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为空白组、模型组、美沙拉嗪组、低、中、高剂量中药组。除空白组外,其余小鼠置于高温、高湿环境,喂养高糖高脂饲料,饮用 2.5% 葡聚糖硫酸钠(DSS)蒸馏水 1 周造成 UC 湿热证模型。低、中、高剂量中药组分别予浓度 8.125、16.250、32.500 g/(kg·d) 清肠化湿方灌胃,美沙拉嗪组小鼠予美沙拉嗪溶液灌胃,空白组和模型组给予相同体积的生理盐水灌胃。灌胃 7 天,观察小鼠的一般情况、体重、粪便性状及隐血情况,进行 DAI 评分,记录小鼠每小时排出的湿粪粒数以及湿粪重量,测量小鼠结肠长度。HE 染色观察结肠病理情况;Western Blot 法检测结肠 NLRP6、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白(Caspase-1)、紧密连接蛋白(Claudin-2)、Claudin-5 表达水平;ELISA 法检测血清白细胞介素-18(IL-18)、IL-1 β 含量;Real-time PCR 法检测结肠 NLRP6、caspase-1、Claudin-2、Claudin-5 mRNA 表达水平。结果 与空白组比较,模型组小鼠 DAI 评分升高($P<0.01$),结肠长度变短($P<0.01$);结肠黏膜病理受损严重;NLRP6、Claudin-5 蛋白表达降低($P<0.05$),Caspase-1、Claudin-2 蛋白表达增加($P<0.05$, $P<0.01$);血清中炎症因子 IL-1 β 含量增高($P<0.05$);NLRP6、Claudin-5 mRNA 表达降低($P<0.01$),Caspase-1、Claudin-2 mRNA 表达增加($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组、中剂量中药组 DAI 评分降低($P<0.01$),结肠长度增长($P<0.01$)、病理情况改善;中剂量中药组 NLRP6、Claudin-5 蛋白表达上调($P<0.05$),各治疗组 Caspase-1 蛋白表达减少($P<0.05$),美沙拉嗪组及中、高剂量中药组 Claudin-2 蛋白表达减少($P<0.01$);美沙拉嗪组及低、中剂量中药组血清 IL-1 β 含量降低($P<0.05$, $P<0.01$),美沙拉嗪组、高剂量中药组 NLRP6 mRNA 表达上调($P<0.01$, $P<0.05$),各治疗组 Caspase-1 mRNA 表达下调($P<0.05$),美沙拉嗪组及中、高剂量组 Claudin-2 mRNA 表达下调,中、高剂量组 Claudin-5 mRNA 表达上调($P<0.05$)。结论 清肠化湿方能够调节 NLRP6 蛋白及相关炎症因子、紧密连接蛋白表达水平,从而减轻肠道炎症反应,缓解肠黏膜损伤。

关键词 溃疡性结肠炎;清肠化湿方;pyrin 结构域蛋白 6;白介素-1 β ;白介素-18

Effect of Qingchang Huashui Recipe on Expressions of NLRP6 Protein and Related Inflammatory Factors in Ulcerative Colitis Mice with Dampness Heat Syndrome FU Shu-shan¹, ZHU Lei², WANG Qiong³, and SHEN Hong² 1 First Clinical Medical School, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210046); 2 Department of Gastroenterology, Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Nanjing (210029); 3 Department of Pharmacology, Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Nanjing (210029)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Qingchang Huashi Recipe (QCHSR) on the expressions of Nodlike receptor pyrin domain6 (NLRP6) and related inflammatory factors, and tight junction pro-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81873260, 81673905);国家重点研发计划(No. 2017YFC1700104);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(No. 苏政办发[2018]87号);南京中医药大学中医学优势学科三期项目开放课题(No. ZYX03KF023)

作者单位:1.南京中医药大学第一临床医学院(南京 210046);2.南京中医药大学附属医院,江苏省中医院消化科(南京 210029);3.南京中医药大学附属医院,江苏省中医院药理室(南京 210029)

通讯作者:沈洪, Tel: 025-86617141, E-mail: shenhong999@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200309. 312

tein Claudin-2 and Claudin-5 in ulcerative colitis (UC) mice with dampness heat syndrome (DHS).

Methods Sixty male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, Western medicine group (WM, Mesalazine solution, 0.1675 g/kg per day), low, medium, and high dose QCHSR group (8.125, 16.250, 32.500 g/kg per day), 10 mice in each group. Except for the control group, mice in the remaining groups were fed with distilled water containing 2.5% Dextran Sodium Sulfate for 1 week, and high fat high sugar forage in high temperature and high humidity environmental to establish UC mice with DHS model. All medication lasted for 7 days after modeling. Corresponding medication was respectively administered to each treatment group by gastrogavage. Equal volume of normal saline was administered to mice in the control group and the model group respectively. The general conditions, body weight, fecal traits, occult blood, and disease activity index (DAI) score, the defecation amounts and weights in every hour were recorded respectively. The length of colon was measured. After sampling pathological changes of colons were observed by HE staining. Western Blot was used to detect the expression levels NLRP6, Caspase-1, Claudin-2 and Claudin-5 protein in colon tissue of mice. ELISA kit was used to detect the serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18. The expressions of the genes of NLRP6, Caspase-1, Claudin-2 and Claudin-5 in the colon were detected by real-time PCR. **Results** Compared with the control group, DAI score increased ($P<0.01$) and colonic length was shortened in the model group ($P<0.01$). The pathological damage of colonic mucosa were severe. The expressions of NLRP6 and Claudin-5 were down-regulated ($P<0.05$), the expressions of Caspase-1 and Claudin-2 were up-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$). Serum IL-1 β concentration increased ($P<0.05$). Expressions of NLRP6 and claudin-5 mRNA decreased ($P<0.01$), the expressions of Caspase-1 and Claudin-2 mRNA increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, DAI score decreased ($P<0.01$), colonic length elongated ($P<0.01$), and pathological conditions were improved in the WM group and the medium dose QCHSR group. Expression of NLRP6 and Claudin-5 were up-regulated in the medium dose QCHSR group ($P<0.05$). The expression of Caspase-1 was down-regulated in each treated group ($P<0.05$). The expression of Claudin-2 was down-regulated in the WM group, and medium/high dose QCHSR group ($P<0.01$). The serum IL-1 β concentration decreased in the WM group, and medium/low dose QCHSR group ($P<0.05$, $P<0.01$). The expression of NLRP6 mRNA was up-regulated in the WM group, and high dose QCHSR group ($P<0.01$, $P<0.05$). The expression of Caspase-1 decreased in each medicated group ($P<0.05$). The expression of Claudin-2 mRNA was down-regulated in the WM group, and medium/low dose QCHSR group ($P<0.05$). The expression of Claudin-5 was up-regulated in the medium/high dose QCHSR group ($P<0.05$). **Conclusion** QCHSR regulated expressions of NLRP6 and related inflammatory factors, and tight junction protein Claudin-2 and Claudin-5, thus attenuating intestinal inflammatory reactions and relieving intestinal mucosal injury.

KEYWORDS ulcerative colitis; Qingchang Huashi Recipe; Nodlike receptor pyrin domain6; interleukin-1 β ; IL-18

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种以腹痛、腹泻伴黏液脓血便以及其他非特异性全身症状为临床特征的疾病。病变部位以结直肠多见。UC 的发病机制尚不明确, 现认为该病的发生与基因、免疫、感染、环境等因素有关; 中医学则认为湿热蕴肠、气滞络瘀为基本病机, 脾虚失健为主要发病基础, 饮食不节是主要发病诱因, 中医学将 UC 分为 6 个主要证型^[1]: 大肠湿热证、脾虚湿蕴证、寒热错杂证、肝郁脾虚证、脾肾阳虚证、阴血亏虚证, 其中以大肠湿热证最为常见。目前西医临床上常用氨基水杨酸类、糖皮质激素、免疫抑制剂、抗生素、微生态调节剂及生物制剂等治疗

UC, 长期用药会产生较多的不良反应; 而中医药治疗 UC 疗效显著, 不良反应少^[2]。

核苷酸结合寡聚化结构域样受体 (nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors, NLRs) 家族是一类庞大的主要参与机体固有免疫的炎症蛋白家族, 在炎症相关疾病中起着关键作用, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体含 pyrin 结构域蛋白 6 (NLR family, pyrin domain containing6, NLRP6) 是 NLRs 家族中一个功能较独特的蛋白, 其在肠道表达较高, NLRP6 可与含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteine-specific aspartate specific proteinase-1,

Caspase-1) 和含 CARD 结构域的凋亡相关颗粒样蛋白 (apoptosis associated speck-like protein containing CARD, ASC) 通过 N 端 PYD 结构域的蛋白-蛋白连接作用组成细胞内多聚蛋白复合物, 即 NLRP6 炎症小体 (NLRP6 inflammasome), 参与炎症反应免疫应答。近年来, 越来越多的研究表明, 炎症小体与肠道相关疾病有着密切的联系。Levy M 等^[3] 发现肠道微生物的代谢物是通过调节 NLRP6 炎症小体信号通路来影响肠道微生态环境。Yin J 等^[4] 发现 NLRP6 炎症小体能保护肠上皮细胞。Opipari A 等^[5]、郑沁薇等^[6] 发现炎症小体在肠道炎症中发挥的作用。国内研究也发现一些中药复方能通过影响炎症小体的表达来发挥治疗小鼠 UC 的作用^[7,8]。清肠化湿方是沈洪教授根据清代刘完素芍药汤化裁而成, 具有清热燥湿、凉血解毒的功能, 切合病机, 且经国家“十一五”科技支撑计划项目大样本、多中心、随机、对照、非劣性研究验证, 治疗 UC 疗效可靠^[9]。

因此本实验采用高脂高糖饲料喂食造成内湿, 高温高湿环境造成外湿, 诱导小鼠湿热证候, 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 诱导小鼠结肠炎模型^[10], 观察清肠化湿方对小鼠 NLRP6 及相关炎症因子表达水平的影响, 在体内是否有调节 NLRP6 表达水平, 调节紧密连接蛋白 Claudin-2、Claudin-5 表达的作用, 从而为其临床上治疗 UC 湿热证提供实验依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 60 只, 体重 20~22 g, 鼠龄 6~8 周, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司南京分公司, 动物合格证号: SYXX8 (苏)2017-0069。于南京中医药大学动物实验中心动物房饲养, 温度 23~27 ℃, 相对湿度 40%~60%, 室内通风良好, 每日光照 10~12 h, 适应性饲养 1 周。动物实验方法符合南京中医药大学动物实验伦理规程。

2 药物与试剂 清肠化湿方 (黄连 3 g、黄芩 10 g、煨木香 6 g、炒白芍 15 g、生地榆 15 g 等) 中药购自江苏省中医院药房, 称取清肠化湿方药物, 加 10 倍水量浸泡 1 h 后煎煮 2 次, 合并两次药液, 浓缩, 制备成浓度分别为 2.2、1.1、0.55 g/mL 的清肠化湿方水煎液。DSS (美国 MP Biomedicals 公司, 批号: 0216011050); 美沙拉嗪缓释颗粒 (上海爱的发制药有限公司, 规格: 500 mg/袋, 批号: H20143162), 研磨后配制成 10.84 mg/mL 的混悬液。小鼠 IL-1 β 、IL-18 酶联免疫吸附法检测试剂盒 (杭州联科生物公司, 批号分别为: A201B81053、A21880814); 兔抗鼠 NLRP6 (德国

Merck Millipore 公司, 批号: 3046768)、兔抗鼠 caspase-1 (德国 Merck Millipore 公司, 批号 3141396)、兔抗鼠 Claudin-2 (美国 CellSignaling 公司, 批号: 48120)、兔抗鼠 Claudin-5 单抗 (德国 Merck Millipore 公司, 批号: 2933202); Trizol TM Reagent RNA 提取剂 (美国 Invitrogen 公司, 批号: 15596026); HiScript II QRT SuperMix for Qpcr, AceQ Universal、SYBR qPCR Master Mix (美国 Vazyme 公司, 批号分别为: Q711-02, R223-01); PCR 引物 (南京 Invitrogen 公司)。荧光定量 PCR 仪, 7500fast (美国 ABI 公司); PCR 扩增仪, 2720 型 (美国 ABI 公司); Mini-Trans Cell 电泳槽, PowerPac Basic 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); CHEMIDOC XRS + 凝胶成像仪 (日本 Bio-Rad 公司); 倒置显微镜 IX51, 日本 Olympus 公司; 冷冻离心机 5804R (德国 Eppendorf 公司); 超低温冰箱, MDF-38 (日本三洋公司)。

3 分组、UC 湿热证模型的制备及干预方法 60 只小鼠随机分成空白组、模型组、美沙拉嗪组、低剂量中药组、中剂量中药组、高剂量中药组, 每组 10 只。采用灌服 DSS 溶液配合饮食加环境复合法建立小鼠 UC 湿热证模型^[10]: (1) 湿热证小鼠造模方法: 给予小鼠高糖高脂饲料, 自由引用 200 g/L 蜂蜜水。将造模小鼠置于温度 35 ℃, 湿度 85%, 每日持续 8 h。以上造模持续两周。(2) UC 小鼠造模方法: 湿热证小鼠造模成功后, 予小鼠自由饮用由蒸馏水配置的 2.5% DSS 溶液, 连续 7 天, 制备 UC 小鼠模型。各组小鼠于造模成功后第 2 天给予相应的药物灌胃, 每天 1 次, 连续 7 天。根据体表面积换算法, 低剂量中药组给予清肠化湿方水煎液每天 8.125 g/kg 灌胃, 相当于成人剂量的 1/2。中剂量中药组给药剂量为每天 16.250 g/kg, 相当于成人等效剂量。高剂量中药组给药剂量为每天 32.500 g/kg, 相当于成人剂量的两倍。美沙拉嗪组给药剂量为每天 0.1675 g/kg。空白组和模型组予相同体积的生理盐水灌胃。给药 7 天后, 处死小鼠。给药过程中, 空白组、美沙拉嗪组、高剂量中药组均有 4 只小鼠因为灌胃液误入气管死亡。

4 取材 用镊子摘取小鼠一侧眼球, 取血, 离心, 吸取上层的血清, -80 ℃ 保存, 备用。剖开小鼠腹部暴露腹腔, 取出肛门上 2 cm 至盲肠的整段结肠。沿肠系膜边缘纵向剖开, 用生理盐水冲洗肠内容物。将一部分放入 10% 福尔马林缓冲液中固定备用, 剩下的肠段迅速放入液氮中, 置于 -80 ℃ 保存。

5 检测指标及方法

5.1 一般情况、疾病活动指数及结肠长度 每

天观察小鼠毛色、精神状态、尿液颜色等一般情况,记录小鼠每小时内排出的湿粪数目及湿粪重量,测量记录小鼠体重、粪便状况、及大便潜血情况,大便潜血情况采用邻联甲苯胺法检测^[8],进行小鼠疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分,评分标准见表 1。给药结束后取材时,测量各组小鼠的结肠长度。

表 1 DAI 评分标准

计分(分)	体重下降率(%)	大便性状	便血情况
0	无	正常便	潜血(-)
1	1~5	松散便	潜血(+)
2	6~10		潜血(++)
3	11~15	稀便	潜血(+++)
4	>15		肉眼血便

注:每只小鼠 DAI 评分为 3 项评分的平均值

5.2 结肠病理切片观察 处死小鼠后,留取小鼠结肠组织于多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋,切片厚 4~5 μm ,行常规 HE 染色,光镜观察。

5.3 Western Blot 检测结肠组织 NLRP6、caspase-1、Claudin-2、Claudin-5 表达水平 取组织样本 100 mg,剪碎后加裂解液匀浆至充分裂解;BCA 法进行蛋白定量算出上样量;电泳(浓缩胶电压为 80 V,跑至分离胶时调为 120 V,条带跑至底部时即停止);电转,恒流 200 mA,60 min;PVDF 膜置于 5%脱脂奶粉溶液,室温封闭 60 min;TBST 洗膜后置于 1 抗稀释液 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, TBST 10 min 洗 3 次置于 2 抗稀释液 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 1 h;TBST 10 min 洗 3 次,显影。采用 ECL 液进行发光及条带分析。

5.4 ELISA 法检测小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 表达水平 严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行测定:包被液稀释抗原,封板膜封板后于室温孵育 1.5 h。弃旧液,每孔加入 100 μL 链霉亲和素及显色底物 TBM,室温避光孵 30 min。每孔加入 100 μL 终止液,充分混匀,待颜色由蓝色变为黄色,于酶标仪 450 nm 和 570 nm 处进行双波长检测。校准 OD 值 = OD_{450 nm} - OD_{570 nm},绘制标准曲线并计算各因子含量。

5.5 实时荧光定量 PCR (SYBR 染料法)检测

NLRP6、caspase-1、Claudin-2、Claudin-5 mRNA 表达水平

5.5.1 引物设计 引物序列参照 Gene Bank 数据库中基因的序列,引物由南京 invitrogen 公司合成。引物序列,见表 2。

5.5.2 总 RNA 提取、逆转录、Real-time PCR 取适量小鼠结肠组织,约 100 mg,1 mL Trizol 充分裂解,氯仿萃取后,异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤后,溶于 20 μL DEPC 无酶水中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。于紫外分光光度计检测所提 RNA 浓度及纯度,确保 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 为合格。按照逆转录试剂盒说明,将 RNA 为模版逆转录成 cDNA,反应条件为 50 $^{\circ}\text{C}$, 15 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 s。以 cDNA 为模版扩增目的基因,反应体系总体积为 20 μL (SYBR Premix Ex Taq (2x) 10.0 μL , 上下引物各 0.4 μL , DNA 模板 1 μL , DEPC 水 8.2 μL 。反应条件:预变性(95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 循环 1 次); 扩增过程(95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s), 循环 40 次; 融解曲线分析: 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 60 s; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 循环 1 次。引物 Invitrogen 公司合成,核苷酸序列及引物长度见表 2。采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 方法对 qPCR 结果进行数据分析,计算 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$ 目的基因 - Ct 内参基因; $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ 给药组 - ΔCt 对照组; 各 mRNA 相对表达量 = 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} , 其中空白对照组的数值均为 1。

6 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,先对两组数据行正态性检验和方差齐性分析,若符合正态性检验的两组间比较采用 t 检验,若不符合正态分布,则行非参数多重秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般情况

1.1 模型组湿热证表现及两组体重、湿粪粒数和湿粪重量比较(表 3) 模型组小鼠出现嗜睡懒动、疲倦、体重减轻、大便黏滞、尿黄尿少,符合湿热证表现,提示湿热证模型造模成功。与空白组比较,模型组小鼠体重下降($P < 0.05$),湿粪粒数和湿粪重量均增加($P < 0.01$)。

表 2 引物序列

引物	上游序列	下游序列	引物长度(bp)
β -actin	5'-ACGGCCAGGTCATCACTATT-3'	5'-CTTCTGCATCCTGTCAGCAA-3'	20
NLRP6	5'-GCAGAAATACGCGGCTTC-3'	5'-AGTGCAAACAGCGTCTCGT-3'	20
Caspase-1	5'-GATGGCACATTTCCAGGACT-3'	5'-GAGGGCAAGACGTGTACGA-3'	20
claudin-2	5'-CAAAGCCAAGAGTGAGTTCAA-3'	5'-TCATTCTACCCTCAGCAGCA-3'	20
claudin-5	5'-CCTTCCTGGACCACAACATC-3'	5'-CGCCAGCACAGATTCAACA-3'	20

表 3 两组小鼠体重、湿粪粒数和湿粪重量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体重(g)	5 h 湿粪粒数(粒)	5 h 湿粪重量(mg)
空白	10	26.60±1.09	11.20±3.12	106.74±44.82
模型	10	25.34±0.92*	21.00±3.94**	169.50±38.30**

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

1.2 UC 的表现 空白组小鼠毛色正常,饮食正常,模型组灌服 2.5% DSS 后小鼠出现肉眼血便,中剂量中药组、美沙拉嗪组给药后,小鼠的血便、毛色、精神状态逐渐好转。

2 各组小鼠 DAI 评分及结肠长度比较(表 4) 与空白组比较,模型组小鼠 DAI 评分升高($P<0.01$),结肠长度缩短($P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组、中剂量中药组 DAI 评分降低($P<0.01$),结肠长度增加($P<0.01$)。

表 4 各组小鼠 DAI 评分和结肠长度比较 ($\bar{x} \pm s$)

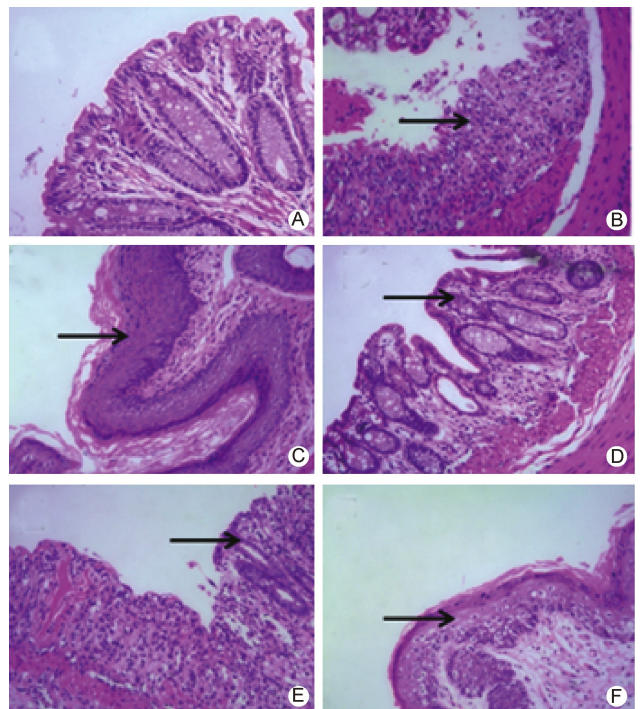
组别	<i>n</i>	DAI 评分(分)	结肠长度(cm)
空白	6	0.00±0.00	9.62±0.39
模型	10	3.33±0.87*	6.51±0.79*
美沙拉嗪	6	0.72±0.68 Δ	9.06±0.62 Δ
低剂量中药	10	2.90±1.21	6.35±0.49
中剂量中药	10	0.67±0.92 Δ	7.82±0.93 Δ
高剂量中药	6	3.56±0.34	6.70±0.64

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.01$

3 各组小鼠结肠组织病理学变化比较(图 1) 空白组结肠结构完整清晰,其隐窝结构完整,杯状细胞未见破坏;模型组主要表现为局部见黏膜糜烂、溃疡形成;低、中、高剂量中药组与模型组比较,黏膜糜烂、溃疡形成等都有所减轻。

4 各组小鼠血清 IL-1 β 和 IL-18 表达比较(表 5) 与空白组比较,模型组小鼠血清 IL-1 β 含量增高($P<0.05$)。与模型组比较,美沙拉嗪组及低、中剂量中药组小鼠血清 IL-1 β 含量降低($P<0.05$, $P<0.01$),各组小鼠血清 IL-18 含量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

5 各组小鼠 NLRP6、Caspase-1、Claudin-2、Claudin-5 蛋白表达比较(图 2,表 6) 与空白组比较,模型组 NLRP6、Claudin-5 蛋白表达降低($P<0.05$),Caspase-1、Claudin-2 蛋白表达升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,中剂量中药组 NLRP6 蛋白表达升高($P<0.05$),美沙拉嗪组及低、中、高剂量中药组 Caspase-1 蛋白表达降低($P<0.05$),美沙拉嗪组及中、高剂量中药组 Claudin-2 蛋白表达降低($P<0.01$),中剂量中药组 Claudin-5 蛋白表达升高($P<0.05$)。



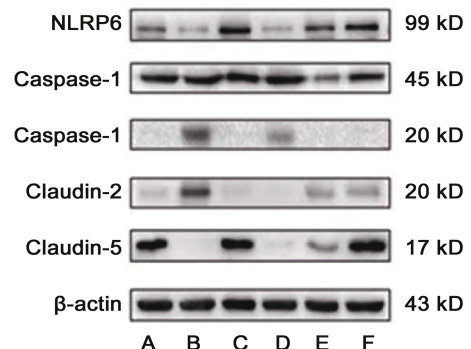
注:A 为空白组;B 为模型组;C 为美沙拉嗪组;D 为低剂量中药组;E 为中剂量中药组;F 为高剂量中药组;图 2 同;箭头所指为病变及改善情况

图 1 各组小鼠结肠组织病理观察 (HE,×200)

表 5 各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 表达比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1 β	IL-18
空白	6	2.64±1.50	22.35±16.41
模型	6	5.63±2.39*	11.80±4.65
美沙拉嗪	6	2.06±0.69 Δ	32.46±27.97
低剂量中药	6	1.51±0.52 $\Delta\Delta$	24.39±35.04
中剂量中药	6	2.21±0.98 $\Delta\Delta$	67.93±26.44
高剂量中药	6	5.03±2.60	206.40±14.99

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$



注:45 kD 的 Caspase-1 指无活性的 Caspase-1 酶原,20 kD 的 Caspase-1 指切割后具有活性能发挥作用的 Caspase-1

图 2 各组 NLRP6、Caspase-1、Claudin-2、Claudin-5 蛋白电泳图

表 6 各组小鼠 NLRP6、Caspase-1、Claudin-2、Claudin-5 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP6/ β -actin	Caspase-1/ β -actin	Claudin-2/ β -actin	Claudin-5/ β -actin
空白	3	0.83 $\pm$ 0.20	0.07 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.18	3.59 $\pm$ 1.16
模型	3	0.44 $\pm$ 0.13*	1.57 $\pm$ 0.49*	1.23 $\pm$ 0.04**	0.34 $\pm$ 0.24*
美沙拉嗪	3	1.62 $\pm$ 1.89	0.11 $\pm$ 0.04 Δ	0.16 $\pm$ 0.07 $\Delta\Delta$	5.41 $\pm$ 3.73
低剂量中药	3	0.99 $\pm$ 0.72	0.54 $\pm$ 0.35 Δ	0.29 $\pm$ 0.41	0.83 $\pm$ 0.24
中剂量中药	3	1.16 $\pm$ 0.39 Δ	0.17 $\pm$ 0.17 Δ	0.29 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta$	2.81 $\pm$ 1.03 Δ
高剂量中药	3	1.38 $\pm$ 1.38	0.08 $\pm$ 0.06 Δ	0.26 $\pm$ 0.15 $\Delta\Delta$	3.98 $\pm$ 3.15

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

表 7 各组小鼠结肠组织 NLRP6、Caspase-1、Claudin-2、Claudin-5 mRNA 相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP6	caspase-1	Claudin-2	Claudin-5
空白	3	0.87 $\pm$ 0.17	0.82 $\pm$ 0.12	1.02 $\pm$ 0.25	0.90 $\pm$ 0.13
模型	3	0.22 $\pm$ 0.079**	78.69 $\pm$ 8.63*	29.08 $\pm$ 9.58**	0.15 $\pm$ 0.07**
美沙拉嗪	3	4.68 $\pm$ 0.45 $\Delta\Delta$	0.71 $\pm$ 0.21 Δ	3.83 $\pm$ 2.17 Δ	0.23 $\pm$ 0.09
低剂量中药	3	0.29 $\pm$ 0.11	4.29 $\pm$ 1.69 Δ	15.85 $\pm$ 4.20	0.15 $\pm$ 0.11
中剂量中药	3	6.75 $\pm$ 2.52	0.64 $\pm$ 0.10 Δ	2.69 $\pm$ 1.27 Δ	0.63 $\pm$ 0.01 Δ
高剂量中药	3	11.81 $\pm$ 1.95 Δ	0.12 $\pm$ 0.01 Δ	4.77 $\pm$ 0.80 Δ	0.83 $\pm$ 0.20 Δ

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

6 各组小鼠结肠组织 NLRP6、Caspase-1、Claudin-2、Claudin-5 mRNA 相对表达水平比较(表 7) 与空白组比较,模型组 NLRP6、Claudin-5 mRNA 表达降低($P<0.01$),caspase-1、Claudin-2 mRNA 表达升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,美沙拉嗪组、高剂量中药组小鼠 NLRP6 mRNA 表达升高($P<0.01$, $P<0.05$),美沙拉嗪组及低、中、高剂量中药组 Caspase-1 mRNA 表达降低($P<0.05$),美沙拉嗪组及中、高剂量中药组 Claudin-2 mRNA 表达降低($P<0.05$),中、高剂量中药组 Claudin-5 mRNA 表达升高($P<0.05$)。

讨 论

UC 是临床难治性疾病之一,随着经济的不断发展,我国的 UC 发病率呈快速上升趋势^[11]。中医学认为其活动期的主要病机是湿热蕴结于血分,脉络受损,肠道传导失司,而出现腹泻、黏液血便等症状。清肠化湿方中,黄芩、黄连清热燥湿;煨木香、白芷理气燥湿止痛;炒白芍、生甘草柔肝缓急止痛;生地榆、茜草、紫草凉血止血,契合病机。

UC 发病机制尚未完全明确,但免疫机制被普遍认为是 UC 的发病机制中起着十分关键的作用^[12]。研究表明,NLR 受体家族在促炎细胞因子的合成和分泌中发挥着重要作用,而促炎与抗炎细胞因子失调与肠道炎症的发生进展情况密切相关^[13,14]。NLRP6 高表达于肠上皮细胞,对维持肠道内外环境的稳态和健康的肠道微生物群发挥着重要的作用^[3],NLRP6 蛋白激活后能 NLRP6 炎症小体的组装,减少活化的

caspase-1,减少 pro-IL-1 β 的剪切从而减少 IL-1 β 释放,IL-1 β 通过产热、激活淋巴细胞和促进急性蛋白的合成等作用引起全身性或局部性损伤。

肠黏膜是人体与外界环境接触面积最大的结构,它既可以选择性地从外界吸收营养物质,又可以阻止诸如细菌及其代谢产物等的侵入。肠黏膜屏障的完整性对保持机体健康、防止组织损伤和疾病至关重要^[15]。其中紧密连接蛋白构成的分子屏障是固有免疫的主要组成部分,能够有效的阻止病原微生物透过上皮细胞层引起疾病,同时,还能够有效分隔细胞顶端和细胞其他部分,从而防止膜蛋白相互混合。其中 claudins 为跨膜蛋白,功能最为重要,是构成紧密连接的主要骨架蛋白^[16]。人类 Claudin 蛋白家族至少有 24 个成员,均包含 4 个跨膜区域和 2 条细胞外链,2 条细胞外链中均包含有带不同电荷的氨基酸残基和 2 个细胞内尾巴^[17]。Claudin-2 蛋白又称孔道封闭蛋白,辅助形成离子通道选择性钙离子经细胞旁转运,在维持肠黏膜屏障有着重要地位。研究发现,肠道炎症时 Claudin-2 表达明显增加^[18]。Claudin-5 蛋白是肠上皮细胞通透性与血管内皮细胞通透性调节相关的重要因子,当 Claudin-5 蛋白表达下降时肠道紧密连接功能下降,通透性增加^[19]。

本实验中,高温高湿环境,高糖高脂饲料喂养的小鼠出现湿热证等表现,DSS 所致小鼠体重降低、精神萎靡、腹泻便血等表现,符合 UC 的表现,属于清肠化湿方的主治范围。与模型组比较,各给药组小鼠体重逐渐恢复,状态逐渐好转,结肠长度偏长,结肠病理情况有不同程度的改善。中药组小鼠结肠组织较模型组

NLRP6、Claudin-5 蛋白明显上调, Caspase-1 蛋白、Claudin-2 蛋白明显下降, IL-1 β 的合成和释放减少。

综上所述, 清肠化湿方能促进 UC 湿热证小鼠的恢复, 改善其肠道病理损伤。其治疗作用可能是通过上调 NLRP6 蛋白、下调 Caspase-1 蛋白表达及相关炎症因子 IL-1 β 表达来缓解肠道反应, 同时, 可能通过下调 Claudin-2 蛋白表达、上调紧密连接蛋白 Claudin-5 表达, 恢复肠黏膜功能, 此次研究为临床应用清肠化湿方治疗 UC 湿热证提供了更多的理论依据。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] 张声生, 李乾构, 沈洪, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识(2009)[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(5): 527-532.
- [2] 石俊, 叶柏. 溃疡性结肠炎的中医药治疗近况[J]. 中医学报, 2010, 25(1): 185-187.
- [3] Levy M, Thaïss CA, Zeevi D, et al. Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal micro-environment by regulating NLRP6 inflammasome signaling[J]. Cell, 2015, 163(6): 1428-1443.
- [4] Yin J, Sheng B, Yang K, et al. The protective roles of NLRP6 in intestinal epithelial cells[J]. Cell Prolif, 2018;1-6.https://doi.org/10.1111/cpr.12555.
- [5] Opipari A, Franchi L. Role of inflammasomes in intestinal inflammation and Crohn's disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2015, 21(1): 173-181.
- [6] 郑沁薇, 郝微微, 王凯强, 等. NLRP3 炎症小体对炎症性肠病免疫机制影响的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(6): 389-394.
- [7] 陈良荣. 从 NLRP-6、Caspase-1、IL-18 探讨健脾清热活血方治疗溃疡性结肠炎临床研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2018.
- [8] 沈佳雯. 白术黄芪汤通过抑制 NLRP3 炎症小体治疗 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎[D]. 西安: 西南交通大学, 2018.
- [9] 沈晨, 张声生, 崔超, 等. 清肠化湿法治疗活动期溃疡性结肠炎近期疗效观察[J]. 北京中医药, 2013, 32(6): 415-417, 436.
- [10] 刘思邈, 唐艳萍, 武文静, 等. 中药对湿热型溃疡性结肠炎小鼠 NF κ B p65 及免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2017, 23(5): 518-522.
- [11] Ye L, Cao Q, Cheng J. Review of inflammatory bowel disease in China[J]. Sci World J, 2013; 1-6. https://dx.doi.org/10.1155/2013/296470.
- [12] 潘国宗. 溃疡性结肠炎的病因和发病机制[J]. 现代消化及介入诊疗, 2008, 13(2): 103-105.
- [13] Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes[J]. Cell, 2014, 157(5): 1013-1022.
- [14] Chen GY, Liu M, Wang F, et al. A functional role for NLRP6 in intestinal inflammation and tumorigenesis[J]. J Immunol, 2011, 186(12): 7187-7194.
- [15] Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases[J]. Intest Res, 2015, 13(1): 11-18.
- [16] Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, (36): 166-176.
- [17] Gunzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins[J]. Compr Physiol, 2012, 2(3): 1819-1852.
- [18] Luettig J, Rosenthal R, Barmeyer C, et al. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation[J]. Tissue Barriers, 2015, 3(1-2): e977176.
- [19] Netzel-Arnett S, Buzza MS, Shea-Donohue T, et al. Matriptase protects against experimental colitis and promotes intestinal barrier recovery[J]. Inflamm Bowel Dis, 2012, 18(7): 1303-1314.

(收稿: 2019-07-26 在线: 2020-04-09)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶